

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lea Iličić

6689/BT

UTJECAJ GLUTENA NA PREŽIVLJAVANJE
PROBIOTIČKIH SOJEVA U SIMULIRANIM
UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 4

Mentor: Prof. dr. sc. *Jagoda Šušković*

Zagreb, 06. rujna 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

UTJECAJ GLUTENA NA PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Lea Iličić, 6689/BT

Sažetak: Preživljavanje nepovoljnih uvjeta gastrointestinalnog trakta (GIT) jedan je od ključnih kriterija pri odabiru probiotičkih sojeva jer je GIT ciljno mjesto njihovog djelovanja. Stoga, cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj dodatka glutena ($\gamma=1$ mg/mL) na *in vitro* preživljavanje *Lactobacillus* sojeva u simuliranim sokovima GIT-a. Prema dobivenim rezultatima, dodatak glutena u navedenoj koncentraciji nema značajan učinak na preživljavanje BMK. Osim toga, ispitan je i utjecaj glutena na rast *Lactobacillus* sojeva u optimalnoj MRS hranjivoj podlozi i nije dokazan štetan učinak njegove prisutnosti u podlozi za rast. Kako bi se provjerila kompatibilnost probiotičkih sojeva *in vitro* proveden je test koegzistencije. Naime, bakterije mogu antagonistički djelovati prema drugim bakterijskim sojevima čime snižavaju njihovu sposobnost preživljavanja što posljedično dovodi do smanjenja učinkovitosti primijenjenog probiotika. Rezultati pokazuju da ispitani sojevi mogu rasti kao združena kultura u istoj hranjivoj podlozi.

Ključne riječi: gluten, gastrointestinalni trakt, probiotici, adhezija

Rad sadrži: 27 stranica, 7 slika, 2 tablice, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Pomoć pri izradi: mag. ing. biotechn. Martina Banić

Rad predan: 29. kolovoza 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotics, Enzymes, Probiotics and Starter Cultures Technology

THE IMPACT OF GLUTEN ON SURVIVAL OF PROBIOTIC STRAINS IN SIMULATED CONDITIONS OF GASTROINTESTINAL TRACT

Lea Iličić, 6689/BT

Abstract: The survival of adverse conditions of the gastrointestinal tract (GIT) is one of the main criteria in the selection of probiotic strains because GIT is target location of their work. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of gluten ($\gamma=1$ mg/ml) in the *in vitro* survival of *Lactobacillus* strains in simulated juices of GIT. According to the results, the addition of gluten applied in that concentration does not have a significant impact on the survival of LAB. Additionally, the impact of gluten on the growth of *Lactobacillus* strains in optimal MRS broth was tested and harmful effect of his presence in the growth medium was not proven. In order to verify the compatibility of probiotic strains *in vitro*, coexistence test was conducted. Bacteria can act antagonistic toward other bacterial strains and decrease their ability to survive, what consequently leads to reduction in the effectiveness of the applied probiotic. The results show that the tested strains can grow as a mixed culture in the same medium.

Keywords: gluten, gastrointestinal tract, probiotics, adhesion

Thesis contains: 27 pages, 7 figures, 2 tables, 39 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD, Šušković Jagoda, Professor

Technical support and assistance: mag. ing. biotechn. Martina Banić

Thesis delivered: August, 29th 2016.

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Bakterije mliječne kiseline kao izvor funkcionalnih sastojaka | 2 |
| 2.2. Uporaba bakterija mliječne kiseline kao probiotičkih pripravaka | 3 |
| 2.3. Mehanizam djelovanja probiotika | 4 |
| 2.4. Preživljavanje probiotika u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta domaćina..... | 5 |
| 2.5. Bakterije mliječne kiseline kao izvor starter kultura..... | 6 |
| 2.5.1. Primjena starter kultura i funkcionalnih starter kultura u fermentaciji hrane | 6 |
| 2.5.2. Probiotici kao funkcionalne starter kulture | 7 |
| 2.5.3. Funkcionalne starter kulture korištene u fermentiranim mliječnim proizvodima | 7 |
| 2.5.4. Funkcionalne starter kulture korištene u fermentiranim ne-mliječnim proizvodima | 8 |
| 2.6. Ljudski mikrobiom i njegova povezanost sa zdravljem i pojavom bolesti | 9 |
| 3. MATERIJALI I METODE RADA | 12 |
| 3.1. Materijali..... | 12 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizmi | 12 |
| 3.1.2. Hranjive podloge..... | 12 |
| 3.1.3. Kemikalije..... | 12 |
| 3.1.4. Aparature i pribor..... | 13 |
| 3.2. Metode rada | 14 |
| 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama | 14 |
| 3.2.2. Preživljavanje <i>Lactobacillus</i> sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT-a) uz dodatak glutena | 14 |
| 3.2.2.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva | 14 |
| 3.2.2.2. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom | 14 |
| 3.2.2.3. Inkubiranje stanica <i>Lactobacillus</i> sojeva u simuliranim sokovima gastrointestinalnog sustava kojima je dodan gluten | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.4. Utjecaj glutena na rast <i>Lactobacillus</i> sojeva..... | 15 |
| 3.2.5. Test koegzistencije <i>Lactobacillus</i> sojeva..... | 16 |
| 4. REZULTATI | 17 |
| 4.1. Preživljavanje <i>Lactobacillus</i> sojeva u simuliranim uvjetima GIT-a uz dodatak glutena..... | 17 |
| 4.2. Utjecaj glutena na rast <i>Lactobacillus</i> sojeva | 18 |
| 4.3. Test koegzistencije <i>Lactobacillus</i> sojeva | 20 |
| 5. RASPRAVA | 21 |
| 6. ZAKLJUČCI | 23 |
| 7. LITERATURA | 24 |

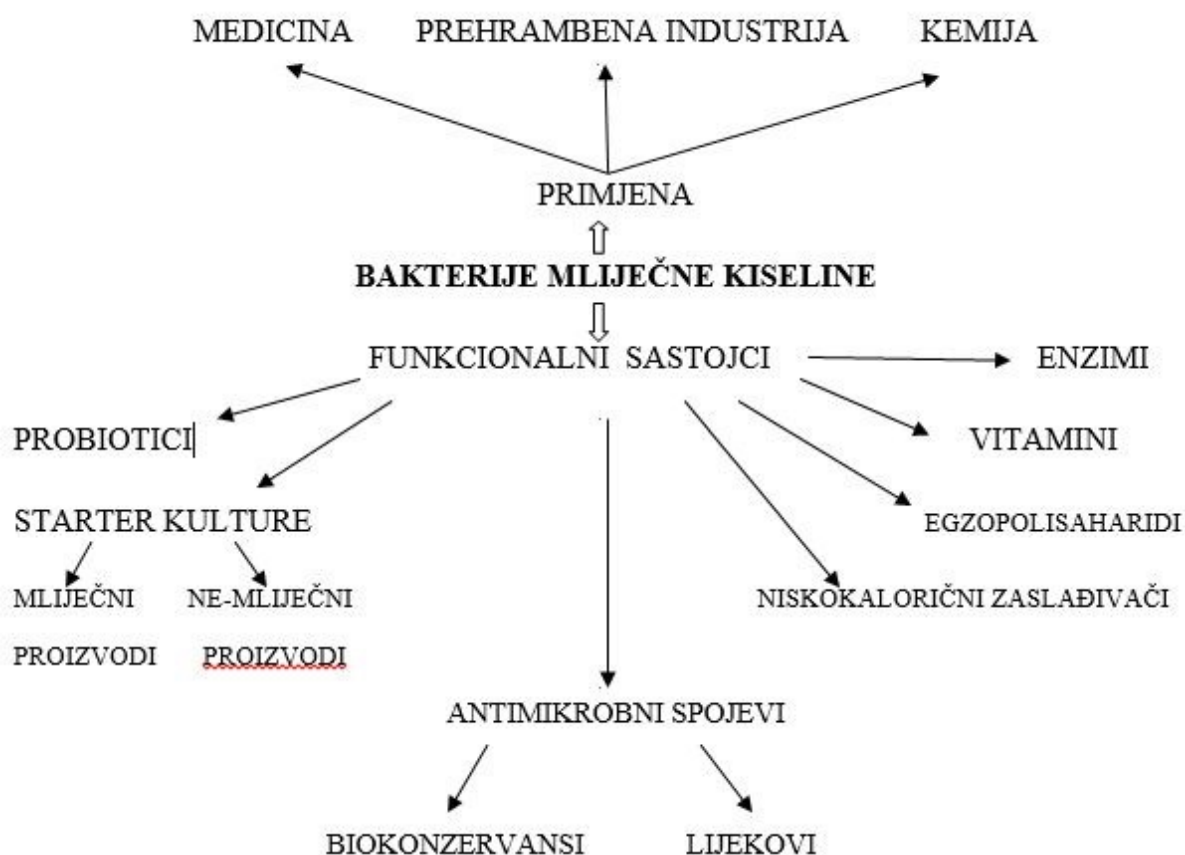
1. UVOD

U novije vrijeme, svjedoci smo rastuće popularnosti probiotika. Po definiciji, probiotici su živi mikroorganizmi, koji primijenjeni u dovoljnoj količini, imaju koristan učinak na zdravlje domaćina (Šušković, 2014). Velika količina autohtonih (prirodno prisutnih) komensalnih bakterijskih vrsta čini mikrobiotu gastrointestinalnog trakta (GIT), usta, nosa i vagine. Unošenje alohtonih (prolaznih) korisnih bakterija, prisutnih u prehrambenim proizvodima i raznim komercijalnim probiotičkim pripravcima, pozitivno utječe na ravnotežu mikrobiote zbog uspostavljanja komensalnih interakcija s autohtonom mikrobiotom domaćina. U današnje vrijeme, probiotici su prepoznati kao najučinkovitije rješenje u prevenciji i terapiji infekcija gastrointestinalnog sustava. Međutim, da bi se neki soj smatrao potencijalnim probiotičkim sojem za komercijalnu upotrebu, mora ispuniti čitav niz strogih zahtjeva koji čine izrazito kompleksnu strategiju za izbor probiotičkih sojeva. Kako bi probiotički soj ispunio svoju terapijsku svrhu u gastrointestinalnom traktu, mora imati sposobnost koagregacije i adhezije na stanice crijevnog epitela, mogućnost kompetitivne ekskluzije patogenih mikroorganizama, ali prvenstveno, sposobnost preživljavanja u gastrointestinalnom traktu. Nepovoljni uvjeti u želucu podrazumijevaju prisutnost pepsina, pH vrijednost pH=2 i udio NaCl 0,5 % (w/v), dok sok tankog crijeva sadrži žučne soli i pankreatin te ima pH vrijednost pH=8. Cilj ovog završnog rada je ispitati otpornost probiotičkih sojeva iz roda *Lactobacillus* na uvjete GIT-a uz dodatak glutena; proteina prisutnog u pšenici, ječmu, piru i raži. Gluten ima višestruku primjenu u prehrambenoj industriji i svakodnevnom prehranom se unosi u velikim količinama u probavni sustav čovjeka te je stoga potrebno ispitati kako djeluje na mikrobiotu GIT-a. Osim toga, ispitan je i njegov utjecaj na rast odabranih sojeva u optimalnoj hranjivoj podlozi.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline kao izvor funkcionalnih sastojaka

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su široko rasprostranjeni mikroorganizmi koje je moguće pronaći u bilo kojem okruženju bogatom ugljikohidratima; u biljakama, fermentiranoj hrani i mukoznim sluznicama ljudi te drugih kopnenih i morskih sisavaca. U ljudskom i životinjskom organizmu, BMK čine dio prirodno prisutne mikrobiote, odnosno tvore vlastiti ekosustav koji prirodno naseljava gastrointestinalni i genitourinarni trakt, koji su naseljeni velikim brojem različitih bakterijskih vrsta s različitom brojnošću sojeva (Aureli i sur., 2011).



Slika 1. Uporaba bakterija mliječne kiseline (BMK) te njihovi funkcionalni sastojci (preuzeto od Florou-Paneri i sur., 2013).

Filogenetski promotreno, BMK pripadaju ogranku Gram pozitivnih bakterija. Podijeljene su, u skladu s njihovom morfologijom, na štapićaste (bacili) i okrugle (koki) bakterije, a u skladu s načinom fermentacije (vrenja) ugljikohidrata na homofermentativne i heterofermentativne bakterije. Homofermentativne BMK metaboliziraju ugljikohidrate i srodne spojeve do mliječne kiseline kao glavnog konačnog produkta vrenja, dok su konačni produkti vrenja heterofermentativnih bakterija mliječna kiselina, etanol, octena kiselina i

ugljični dioksid. Iako mnogi rodovi bakterija proizvode mliječnu kiselinu kao primarni ili sekundarni produkt fermentacije, tipične BMK su one reda *Lactobacillales*, koji uključuje slijedeće rodove: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Sterptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oneococcus*, *Pediococcus*, *Tetragonococcus*, *Aerococcus* i *Weissella* (Hutkins, 2006).

Mnogi sojevi BMK pripadaju najvažnijim skupinama mikroorganizama korištenih u proizvodnji hrane iako neki, poput bakterija iz roda *Pediococcus*, mogu uzrokovati i kvarenje hrane (Johnson-Green, 2002). Bakterije mliječne kiseline se koriste za očuvanje hrane i modifikaciju različitih organoleptičkih svojstava hrane poput okusa i teksture. Različite sojeve BMK je moguće pronaći u mliječnim proizvodima (jogurt, sir), fermentiranom mesu (salame, kobasice), fermentiranom povrću (masline, kiseli kupus), kruhu i dr. (Korhonen, 2010). Osim u proizvodnji hrane, BMK imaju vrlo važnu ulogu u industrijskoj sintezi kemikalija, farmaceutskih proizvoda ili drugih korisnih proizvoda (Slika 1). Također, najnovija istraživanja o biotehnološkoj proizvodnji mliječne kiseline pokazuju da bi ona mogla pružiti rješenje za problem zagađenja okoliša od strane petrokemijske industrije.

2.2. Uporaba bakterija mliječne kiseline kao probiotičkih pripravaka

Promotreno etimološki, pojam probiotik je izveden od grčke riječi “probios”, što znači “za život”. Godine 1974., Parker je definirao probiotike kao “organizme i tvari koji doprinose crijevnoj mikrobnj ravnoteži”. Fuller je 1989. g. definirao probiotike kao “žive mikrobnje dodatke prehrani koji korisno djeluju na domaćina poboljšanjem ravnoteže crijevne mikrobiote”. Definicija probiotika se nadalje modificirala pa glasi: “Probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primjenjene u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture” (Havenaar i Huis in't Veld, 1992; Šušković, 1996). Budući da probiotici mogu kolonizirati gastrointestinalni trakt i dugoročno iskazati svoj učinak bez kontinuirane medicinske intervencije, koriste se cijelo stoljeće za liječenje različitih površinskih infekcija sluznice crijeva i vagine, no njihova uporaba se smanjila nakon otkrića antibiotika. Ipak, zbog sve većeg širenja otpornosti na antibiotike kao i potrebe za smanjenjem troškova liječenja, probiotici se smatraju snažnim oruđem za prevenciju i liječenje različitih stanja i bolesti ljudi i životinja.

Hrana koja sadrži probiotike spada u kategoriju funkcionalne hrane (Stanton i sur., 2001). Mikroorganizmi koji se koriste u proizvodnji komercijalnih probiotika većinom

pripadaju rodu *Lactobacillus*, sa preko stotinu identificiranih vrsta, poput: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* itd. Budući da su bakterije vrlo osjetljive na nepovoljne uvjete okoliša poput pH, kisika i temperature, da bi se mogle koristiti u komercijalne svrhe, moraju ispuniti izvjesne funkcionalne i fiziološke zahtjeve poput: adhezije na intestinalni epitel i kolonizacije lumena probavnog trakta, mogućnosti stabilizacije intestinalne mikrobiote, kompeticije protiv štetnih mikroorganizama, proizvodnje antimikrobnih tvari te stimulacije odgovora imunskog sustava. Postoje i potkategorije probiotika (Ahmed, 2003) u koje ubrajamo: probiotičke lijekove-čija je namjena onemogućiti, liječiti i spriječiti oboljenje, probiotičku hranu-npr. dodaci prehrani, mikrobe za direktnu prehranu životinja i genetski modificirane probiotičke bakterije.

2.3. Mehanizam djelovanja probiotika

Probiotici imaju višestruke i veoma raznolike korisne učinke na domaćina. Glavni mehanizam djelovanja probiotika putem kojeg se poboljšava zaštita sluznice gastrointestinalnog trakta, uključuje:

- a) Antimikrobnu aktivnost: Probiotici sprječavaju kolonizaciju patogenih bakterija smanjenjem intestinalne pH vrijednosti, inhibicijom bakterijske invazije i adhezije na stanice epitela i proizvodnjom antimikrobnih spojeva poput bakteriocina, defenzina, organskih kiselina i vodikovog peroksida. Interakcija BMK sa mukoznim epitelnim stanicama u gastrointestinalnom traktu i limfoidnim stanicama u crijevima pojačava imunski odgovor usmjeren protiv unesenih patogena (Bourlioux i sur., 2003).
- b) Poboljšanje funkcije mukozne barijere u borbi protiv patogena: Navedeno se postiže povećanjem proizvodnje mukusa. Probiotičke bakterije se natječu s patogenim bakterijama za mjesta vezivanja na crijevnom epitelu i na taj način inhibiraju kolonizaciju sojeva poput *Salmonella sp.* i *E. coli* (Sherman i sur., 2005). Probiotičke bakterije dolaze u interakciju s epitelnim stanicama crijeva direktno (putem sastojaka stanice poput DNA, lipoteihoične kiseline i polisaharida na površini stanice) ili indirektno (proizvodnjom bioaktivnih metabolita) (O' Shea i sur., 2012). Poboljšanje funkcije mukozne barijere može biti važan mehanizam putem kojeg probiotici djeluju korisno na domaćina prilikom različitih oboljenja, poput dijabetesa tipa 1.

- c) Imunomodulacija: Specifični sojevi probiotika mogu utjecati na urođenu i stečenu imunost i stoga imaju važnu ulogu u liječenju različitih oboljenja ljudi. Probiotici mogu utjecati na epitelne stanice, dendritičke stanice, monocite/makrofage i na različite tipove limfocita (prirodne stanice ubojice, T-stanice te redistribuciju T-stanica), bilo direktno ili indirektno (Walker, 2008.). Učinak probiotika na B-limfocite i proizvodnju protutijela rezultira povećanjem sekrecije IgA i poboljšanjem reakcije organizma na cijepljenje. Nedavno je izviješteno da probiotici mogu imati pozitivan učinak na dišni sustav sprečavanjem i smanjenjem ozbiljnosti respiratornih infekcija do čega dolazi zbog povećane sekrecije IgA u mukoznoj sluznici bronhija.

2.4. Preživljavanje probiotika u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta domaćina

Temelj početnih istraživanja probiotika su *in vitro* analize za odabir probiotičkih sojeva zbog jednostavnosti izvedbe i niskih cijena. Takvi konvencionalni testovi se još uvijek koriste za brzi rutinski odabir velikog broja sojeva kao potencijalnih probiotičkih kandidata. Jedna od najvažnijih prednosti *in vitro* analiza je mogućnost ispitivanja više kultura mikroorganizama istovremeno. Prema sadašnjim definicijama, probiotici bi trebali biti živi, zbog čega je neophodno da do ciljanih mjesta djelovanja u organizmu dođu živi, iako neka istraživanja potvrđuju hipotezu da i mrtve probiotičke bakterije mogu imati pozitivne učinke za zdravlje.

Početni odabir mikroorganizama se temelji na različitim analizama tolerancije na stresne uvjete (Upadrasta i sur., 2011). Koriste se prikladni *in vitro* testovi za selekciju mikroorganizama na temelju njihove sposobnosti da prežive prolaz kroz različite regije gastrointestinalnog trakta (Joint FAO/WHO Working Group, 2002). Preživljavanje potencijalnih probiotičkih bakterija u stimuliranim uvjetima GIT-a detaljno se istražuje i značajne su različitosti između sojeva. Nakon ingestije, probiotici se prvo susreću s teškim uvjetima niskog pH u želucu i aktivnosti probavnih enzima. Poznato je da pH želuca varira između vrijednosti 1-2 prije, do 4-5 nakon konzumacije hrane, ali većina *in vitro* analiza je usmjerena na odabir kultura mikroorganizama koje podnose ekstremno niske pH vrijednosti. Najuobičajenija metodologija uključuje eksperimente koji proučavaju preživljavanje kultura u uvjetima bez dodatnih hranjivih tvari, kao što su fosfatni pufer ili modificirana podloga za rast, kojima je pH vrijednost pritom podešena na niske vrijednosti. Testovi tolerancije na kiselost, među najjednostavnijim su testovima za izvođenje jer omogućavaju rutinsko

ispitivanje velikog broja mikroorganizama. Nerealno niske pH vrijednosti namještene tijekom tih testova mogu dovesti do gubitka probiotičkih kandidata relativno osjetljivih na kiselost. Mikroorganizmi osjetljivi na kiselost mogu uspješnije preživljavati uvjete niske kiselosti želuca zbog ublažavajućih karakteristika hrane koja se probavlja ili specifičnih sastojaka hrane. Nadalje, mikroorganizmi se najčešće ispituju kao čiste kulture nakon log ili stacionarne faze rasta dok se u stvarnosti probiotici konzumiraju od strane domaćina nakon produžene faze fermentacije, uvjeta procesiranja hrane i skladištenja. Ta faza prije stresnih uvjeta može utjecati na povećanje ili smanjenje rezistencije probiotika na stres tijekom prolaska kroz GIT domaćina, što je specifično za bakterijsku vrstu, odnosno probiotički soj.

2.5. Bakterije mliječne kiseline kao izvor starter kultura

2.5.1. Primjena starter kultura i funkcionalnih starter kultura u fermentaciji hrane

Bakterije mliječne kiseline se već dugo vremena primjenjuju kao starter kulture za fermentaciju hrane i pića jer mogu poboljšati nutricionističke, organoleptičke, tehnološke i uporabne karakteristike proizvoda. BMK iniciraju brzu i adekvatnu acidifikaciju sirovinskih materijala proizvodnjom različitih organskih kiselina iz ugljikohidrata. Mliječna kiselina je najvažniji proizvod ovih bakterija, nakon čega slijedi octena kiselina, ali BMK mogu proizvesti i etanol, bakteriocine, različite sastavnice arome proizvoda, egzopolisaharide i neke enzime (De Vuyst i sur., 2007). U prošlosti se proizvodnja fermentiranih namirnica i napitaka odvijala spontanom fermentacijom koja je moguća zbog prirodnog prisustva mikroflore na sirovinskom materijalu. S vremenom, prehrambena industrija je potaknula direktno dodavanje izabranih starter kultura u sirovinski materijal. Prednosti dobivene takvim načinom fermentacije su visoki stupanj kontrole nad fermentacijskim procesom kao i normizacija konačnog proizvoda.

Starter kulturu možemo definirati kao mikrobn priprava velkog broja jednog ili više sojeva mikroorganizma koji se uvode u sirovinski materijal s ciljem ubrzavanja i usmjeravanja procesa fermentacije, kako bi se proizvele fermentirane namirnice (Ray, 1992). U industriji fermentirane hrane se većinom koriste komercijalne starter kulture za direktnu inokulaciju sirovinskog materijala, koje su dostupne kao smrznuti ili liofilizirani mikrobn preparati (Sandine WE, 1996). Starter kulture moraju imati barem jednu funkcionalnu karakteristiku kojom doprinose fermentacijskom procesu hrane i napitaka, poboljšavati kvalitetu i sigurnost konačnog proizvoda te doprinositi zdravlju pojedinca. Ipak, pri izboru

starter kultura, treba eliminirati neželjene nuspojave poput stvaranja D-mliječne kiseline ili racemata D-mliječne kiseline (DL) te formiranje biogenih amina.

2.5.2. Probiotici kao funkcionalne starter kulture

Probiotičke kulture bakterija mliječne kiseline se ubrajaju u kategoriju uspješnih starter kultura. Metchnikoff je prvi otkrio korisne učinke BMK na ljudsko zdravlje do kojih dolazi konzumacijom jogurta i fermentiranog mlijeka. Trenutno se koriste različite probiotičke kulture u jogurtima, jogurnim napitcima, formulacijama za dojenčad, dodacima prehrani i dr. Jogurt se proizvodi korištenjem bakterija *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kao starter kultura (Shah, 2007). Kako bi proizvođač izabrao bilo koji probiotički soj u svrhu korištenja kao starter kulture ili mješavine sa tradicionalnom starter kulturom (ko-kultura), mora provjeriti slijedeće aspekte: mogućnost rasta i razmnožavanja izabrane probiotičke kulture u korištenom mediju, robusnost organizma-kako bi podnio uvjete zamrzavanja kao i faze sušenja prilikom pripreme, toleranciju na kiselost želučane kiseline i toleranciju na žučne soli tijekom prolaska probiotika kroz gastrointestinalni trakt. Također, sojevi probiotika trebaju biti stabilni kako bismo njihovom primjenom ostvarili zdravstvene beneficije (Tamine i sur., 2005). BMK se koriste kao starter kulture bilo u mliječnim ili ne-mliječnim proizvodima (Tablica 1).

Tablica 1. Bakterije mliječne kiseline korištene kao starter kulture u fermentiranoj hrani (preuzeto od Florou-Paneri i sur., 2013).

| Rod | Primjena kod mliječnih proizvoda | Primjena kod ne-mliječnih proizvoda |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--|
| <i>Lactobacillus sp.</i> | sir, jogurt, kefir | kobasice, kruh dobiven od kiselog tijesta, fermentirano povrće |
| <i>Lactococcus sp.</i> | sir, maslac, kiselo vrhnje | fermentirano povrće |
| <i>Leuconostoc sp.</i> | sir, kiselo vrhnje, neobrano mlijeko | fermentirano povrće |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | sir, jogurt | |
| <i>Pediococcus</i> | - | kobasice, fermentirano povrće |
| <i>Tetragenococcus</i> | - | umak od soje |
| <i>Oenococcus</i> | - | vino |

2.5.3. Funkcionalne starter kulture korištene u fermentiranim mliječnim proizvodima

BMK se tradicionalno koriste pri fermentaciji mliječnih proizvoda kao jednostavan i siguran način za očuvanje takve hrane. Glavne vrste BMK koje se potencijalno mogu koristiti kao probiotičke kulture u mliječnim proizvodima pripadaju rodu *Lactobacillus* spp. (*L.*

acidophilus, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ili rodu *Enterococcus* spp. (*E. faecalis*, *E. faecium*). Mliječni proizvodi se smatraju idealnim namirnicama za unos probiotičkih sojeva u ljudski gastrointestinalni trakt. U te svrhe se najčešće koristi jogurt; nakon čega slijedi fermentirano obrano mlijeko, kefir, sir, sladoled ili smrznuti deserti poput čokoladnog moussa (Aragon-Alegro i sur., 2007).

Proteolitički sojevi BMK se koriste za oslobađanje bioaktivnih peptida nazvanih ACE inhibitori, tj. inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima, koji se istražuju zbog njihove hipotenzijske uloge (Conlin i sur., 2000). Moguće su i druge interakcije između probiotika i starter kultura, bilo u formi sinergizma (npr. kod jogurta) ili antagonizma (npr. lučenjem bakteriocina koji pokazuju antibiotska svojstva). Preporučuje se minimalan broj živih BMK od 10^6 CFU (formiranih jedinica kolonije)/g fermentiranog mliječnog proizvoda, kako bi se pri primjeni ostvarile navedene korisne zdravstvene tvrdnje (Karma i sur., 2007).

2.2.4. Funkcionalne starter kulture korištene u fermentiranim ne-mliječnim proizvodima

Fermentirano meso i mesni proizvodi

Konzerviranje mesa i mesnih proizvoda fermentacijom se koristi još od antičkih vremena i u većini slučajeva je temeljeno na postojanju prirodnih mikroorganizama u mesu. Nedavno, istraživači su započeli razvijati komercijalne starter kulture za potrebu fermentacije mesnih proizvoda, kako bi osigurali normiranu kvalitetu procesa fermentacije. Godine 1995., Niven i suradnici su u SAD-u upotrijebili prvu starter kulturu BMK; čistu kulturu *Pediococcus cerevisiae*.

Ključni zahtjev za izbor starter kulture za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda je brza proizvodnja organskih kiselina na početku fermentacije, što rezultira konačnom pH vrijednosti ispod 5,1 (Ammor i Mayo, 2007). Uslijed promjene pH, mijenjaju se izvorne karakteristike hrane, što rezultira poboljšanjem organoleptičkih karakteristika konačnog proizvoda. Najčešće korišteni sojevi u komercijalnoj primjeni BMK u mesnim proizvodima su pripadnici rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus*, koje je moguće izolirati iz sušenih kobasica, kiselog kupusa ili dimljenog lososa. Za gore navedene sojeve je utvrđeno da imaju najveću mogućnost preživljavanja u kiselim uvjetima i toleranciju na visoke razine žučnih soli.

Uloga starter kultura, kao što je gore navedeno, je osiguravanje kvalitete hrane inaktiviranjem patogenih mikroorganizama kao i mikroorganizama uzročnika kvarenja

proizvodnjom kiselina i bakteriocina. Na taj način se inhibira proizvodnja biogenih amina i rast mikroba bez korištenja antibiotika. Rezultati nekoliko provedenih istraživanja ukazuju da BMK iz mesa i mesnih proizvoda mogu biti otporne na antibiotike (Gevers i sur. 2003). Stoga, prije početka korištenja novih starter kultura ili probiotičkih kultura, važno je provjeriti da ne sadrže prenosive gene za rezistenciju na antibiotike. Osim navedenog, BMK izabrane kao starter kulture za proizvodnju kobasica ne smiju imati amino-dekarboksilaznu aktivnost jer će u suprotnom doći do nastanka biogenih amina u hrani, poput histamina, triptamina, tiramina, kadaverina, putrescina i fenil-etil-amina, koji imaju toksično djelovanje (Suzzi, Gardni, 2003).

Fermentirano povrće

Mliječno-kisela fermentacija povrća je moguća zbog prisutnosti ugljikohidrata. Obično se koristi za proizvodnju fermentiranih sokova iz povrća poput kupusa, crvene cikle, mrkve, celera i rajčice. Također, BMK imaju važnu ulogu pri fermentaciji kiselih krastavaca i stolnih maslina jer utječu na formiranje konačnog okusa i produljuju trajnost proizvoda.

Starter kulture u proizvodnji silaže

Proizvodnja silaže je tradicionalni postupak za očuvanje stočne hrane i u širokoj je uporabi diljem svijeta. Temelji se na postupku prirodne fermentacije, gdje BMK fermentiraju ugljikohidrate topive u vodi u organske kiseline; većinom u mliječnu, octenu ili mravlju kiselinu pri anaerobnim uvjetima. Obično se vrši inokulacija s BMK koje služe za poboljšanje mliječne fermentacije, što rezultira opadanjem pH vrijednosti, inhibicijom rasta štetnih anaerobnih bakterija i očuvanjem nutricionističke vrijednosti i okusa krme. Najčešće korištene starter kulture u proizvodnji silaže su *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentoseceus* i *Lactobacillus acidophilus*, sa uobičajenim vrijednostima od 10^5 do 10^6 CFU/g (Mc Donald i sur., 1991).

2.6. Ljudski mikrobiom i njegova povezanost sa zdravljem i pojavom bolesti

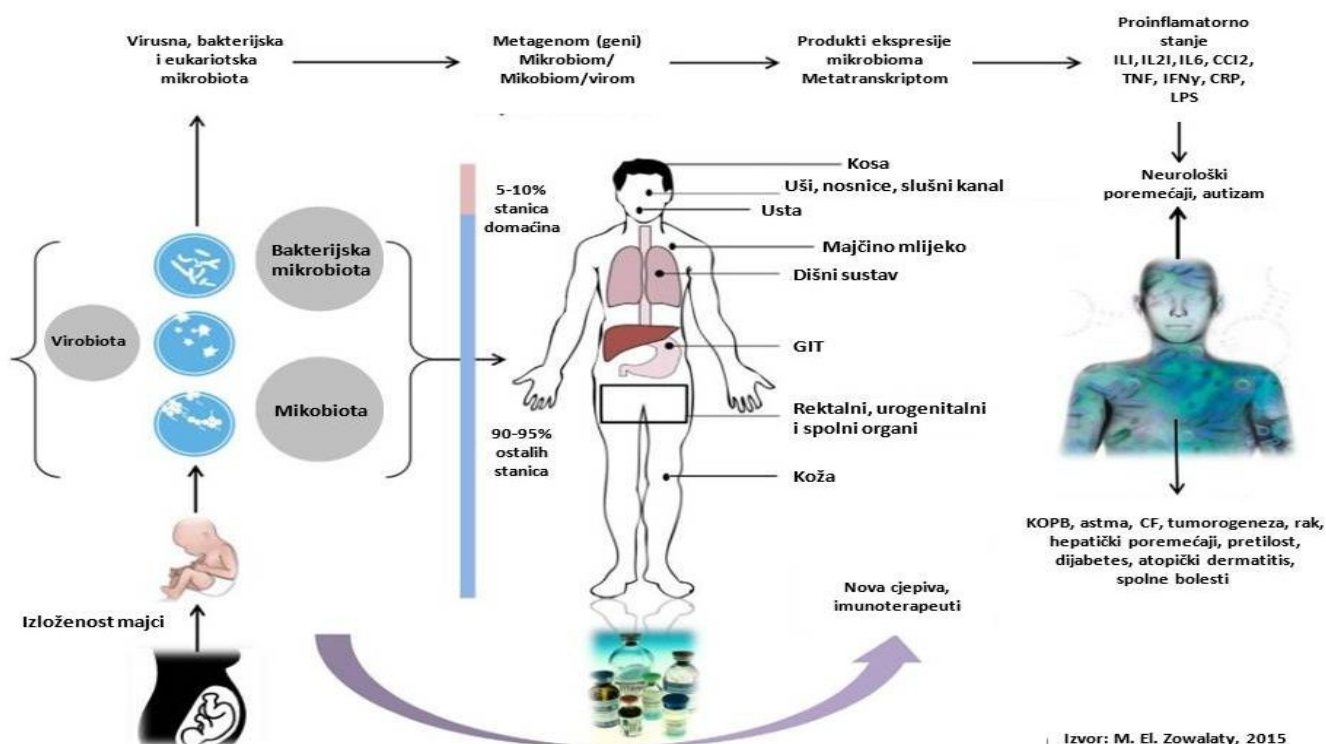
Ljudska mikrobiota je složena i dinamička mikrobna zajednica koja se većinom sastoji od bakterija ali uključuje i druge organizme (protozoe, arheje, viruse i gljivice) koji žive u određenim dijelovima ljudskog tijela poput usne šupljine, ždrijela, jednjaka, želuca, crijeva, urogenitalnog trakta, respiratornog trakta i kože (Cenit i sur., 2014). Procjenjuje se da broj

mikrobnih stanica koje naseljavaju ljudsko tijelo iznosi oko 350 milijardi. što deseterostruko premašuje broj eukariotskih stanica čovjeka (Ley i sur., 2006).

Mikrobiota u crijevima predstavlja najobilniju domenu mikrobnih stanica unutar ljudskog tijela, pri čemu velika većina pripada koljenima *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (Belenguer i sur., 2011). Skup genoma svih mikroorganizama koji čine ljudsku mikrobiotu, a koji su locirani na različitim dijelovima tijela, se naziva ljudski mikrobiom (Cho i Blaser, 2012). Metagenom i metatranskriptom obuhvaćaju istraživanje svih gena i transkripcijom dobivene RNA. Pojam virom se koristi za opisivanje viralnih komponenti bakterijskog i eukariotskog viroma kao i elemenata izvedenih iz virusa, dok se mikrobiom odnosi na gljive unutar ljudske mikrobiote (Paulino i sur., 2006).

Kao što je prikazano na Slici 2., ljudski mikrobiom se sastoji od složenih viralnih (virom), bakterijskih (mikrobiota) i fungalnih (mikrobiota) zajednica i njima pridruženog genetskog materijala. Međusobno djelovanje ljudskog mikrobioma i stanica domaćina utječe na ljudsko zdravlje i patogenezu kod različitih oboljenja. Utvrđene su značajne razlike u količini i raznolikosti mikrobiote kod zdravih pojedinaca (Eckburg i sur., 2005), koje je moguće objasniti postojanjem brojnih faktora, koji uključuju razlike u genetici domaćina, prehrambenim navikama, životnom stilu kao i izlaganju mikroorganizmima tijekom ranih godina života (Laparra i sur., 2010). Osim navedenog, promjene u sastavu ljudske mikrobiote mogu predisponirati određenim imunološkim i patološkim stanjima. Smatra se da je mikrobiom svake osobe jedinstven. Razlike u sastavu mikrobioma nam mogu pomoći objasniti zašto su neke osobe podložnije ili otpornije na izvjesna oboljenja. Istraživanje ljudskog mikrobioma postalo moguće tek nedavno zahvaljujući dostupnosti metagenomskih i metatranskripcijskih analitičkih protokola. Korištenje ovih protokola, omogućuje nam kvalitetniji uvid u prirodu međusobnog odnosa mikrobiote i domaćina te njihovog utjecaja na zdravlje i bolesti domaćina.

Podaci prikupljeni dosadašnjim istraživanjima otkrivaju da mikrobiota u crijevima igra glavnu ulogu u promoviranju zdravlja pojedinca, zbog čega se često naziva 'zaboravljenim organom' (O'Hara i Shanahan, 2006). Međusobni odnos između domaćina i mikrobiote je simbiotski i mutualistički, jer jedna strana ima korist od one druge i obrnuto.



Slika 2. Shema koja prikazuje ljudsku mikrobiotu na različitim lokacijama na tijelu. Slika opisuje bakterijsku mikrobiotu, virobiotu i mikrobiotu te njihovu interakciju sa domaćinom koja u konačnici dovodi do različitih patoloških stanja. Slika prikazuje da se virom translocira, cirkulira i stimulira imunološki sustav te inficira bakterijske, gljivične i eukariotske stanice. Donji dio prikazuje međuodnos između mikrobioma i lijekova te ističe kako će napredak u istraživanju mikrobioma pomoći otkriti nove ciljne terapijske lijekove (preuzeto od Althani i sur., 2016).

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U *in vitro* eksperimentima provedenim u ovom završnom radu, ispitana su svojstva tri soja bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* prikazana u Tablici 2. Navedeni sojevi su izolirani, identificirani i pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Sojevi se čuvaju pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola.

Tablica 1. Bakterijski sojevi korišteni u ovom završnom radu

| Bakterijski sojevi | Oznaka soja | Hranjive podloge i uvjeti rasta |
|------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | M92 | MRS, 37 °C, anaerobno |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | D6 | MRS, 37 °C, anaerobno |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | SF9B | MRS, 37 °C, anaerobno |

3.1.2. Hranjive podloge

Za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus*, korištene su optimalne hranjive podloge:

- MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) agar sastava (g/L): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO₄ · 7H₂O 0,1; MnSO₄ · 7H₂O 0,05; Na-acetat 5; agar 20. Podloga se priprema u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge je 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C/15 min.
- MRS bujon: jednakog sastava kao MRS agar, samo bez dodanog agara.

3.1.3. Kemikalije

Prilikom izvođenja eksperimentalnog rada korištene su slijedeće kemikalije:

- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska,
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD,
- etanol, „Kemika“, Hrvatska,
- pepton, „Biolife“, Malazija,

- mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija,
- kvašćev ekstrakt, „Difco“, SAD,
- Tween 80, „Sigma“, SAD,
- magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija,
- manganov sulfat, „Merck“, Njemačka,
- natrijev taurokolat, „Difco“, SAD,
- TEMED, „Sigma“, SAD,
- akrilamid, „Sigma“, SAD,
- metilensko modrilo, „Sigma“, SAD,
- kalcijev klorid, „Kemika“, Hrvatska,
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD,
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska,
- pankreatin iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska,
- goveđa žuč (Oxgall), „Difco“, SAD,
- glukoza,
- natrijeva lužina
- natrijev acetat,
- agar,
- natrijev klorid,
- fiziološka otopina.

3.1.4. Aparature i pribor

U ovom radu korištene su slijedeće aparature i pribor:

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija,
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD,
- mikrotitarske pločice s 96 jažica,
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija,
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija,
- centrifuga 5804R, „Eppendorf“, SAD,
- Petrijeve zdjelice,
- Anaerocult® A. Merck, Njemačka,
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija,

- Hamilton igle, „Hamilton Bonaduz AG“, Švicarska,
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD,
- termostati, „Instrumentarija“, Hrvatska.

3.2. Metode rada

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Svi korišteni probiotički sojevi su čuvani pri -80 °C u MRS odgovarajućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola.

Probiotički sojevi su čuvani pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta probiotički sojevi su inokulirani u svježu optimalnu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u Tablici 2.

3.2.2. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT-a) uz dodatak glutena

3.2.2.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) u 0,5% sterilnoj otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

3.2.2.2. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz uzorka koji sadrži bakterijske stanice pripremljena su odgovarajuća decimalna razrijeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi (100 µL kulture u 900 µL destilirane vode). Petrijeve zdjelice s MRS hranjivom podlogom su naciepljene sa po 100 µL odgovarajućeg razrijeđenja (četvrtog, petog, šestog, sedmog, osmog i devetog). Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su izrasle kolonije i proračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka.

3.2.2.3. Inkubiranje stanica *Lactobacillus sojeva* u simuliranim sokovima gastrointestinalnog sustava kojima je dodan gluten

Kulture bakterija mliječne kiseline, uzgojene preko noći u MRS bujonu u dvije paralele pri uvjetima opisanima u Tablici 2, centrifugirane su 10 min pri 4200 o/min, dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom i podijeljene na dva dijela. U 12 mL simuliranog želučanog soka i 12 mL soka tankog crijeva, dodan je gluten u koncentraciji 1 mg/mL. Biomasa stanica svakog soja, resuspendirana je u 3 mL svakog od pripremljenih sokova.

Početan broj bakterijskih stanica u pripremljenim suspenzijama određuje se indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.2.2. Bakterijske stanice su u simuliranom želučanom soku inkubirane 2 h pri 37 °C, a u simuliranom soku tankog crijeva 4 h pri istim uvjetima. Nakon toga, određen je broj stanica koje su preživjele inkubaciju u priređenim sokovima s dodatkom glutena indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.2.2. Na potpuno isti način, ispitano je preživljavanje druge paralele stanica u simuliranim sokovima GIT-a bez dodatka glutena.

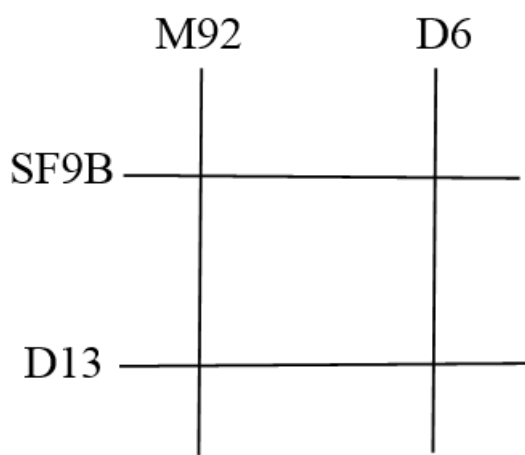
3.2.4. Utjecaj glutena na rast *Lactobacillus sojeva*

Turbidimetrijskim praćenjem rasta uspoređuje se rast kultura odabranih kultura bakterija mliječne kiseline u mikrotitarskoj pločici (Slika 1) pri 37 °C u MRS bujonu s dodatkom glutena (1 mg/mL) u odnosu na čisti MRS bujon. 15 µL prekonoćnih kultura se nanose u 3 paralele u jažice s 235 µL MRS bujona sa ili bez dodatka glutena. Slijepu probu čini 15 µL medija u kojem je uzgojena kultura (čisti MRS bujon) i 235 µL medija u kojem se ispituje rast sojeva (čisti MRS bujon, odnosno MRS bujon s dodatkom glutena (1 mg/mL)).

Nakon nanošenja uzoraka, određuje se početna apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“ pri 620 nm te se pločica inkubira pri 37 °C. Mjerenje apsorbancije se vrši svaka 2 h prvih 6 h jer se tada bakterijske stanice nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, te 22. i 24. h, kada se već nalaze u stacionarnoj fazi rasta. Nakon 24 h izračunavaju se srednje vrijednosti i standardna devijacija te se nacrtaju krivulje rasta svakog bakterijskog soja kako bi se usporedila brzina rasta *Lactobacillus sojeva* u mediju sa i bez dodatka glutena.

3.2.5. Test koegzistencije *Lactobacillus* sojeva

Kako bi se ispitalo međusobno djelovanje sojeva, mikrobiološkom ušicom se naciepe suspenzije prekonoćnih kultura sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *L. brevis* D6, *L. paraplantarum* SF9B i *L. plantarum* D13 povlačenjem crta u obliku mrežice (Slika 3). Na jednu Petrijevu zdjelicu s MRS podlogom se stavlja najviše 6 sojeva. U ovom eksperimentu su na MRS podlogu naciepljena četiri ranije navedena bakterijska soja iz roda *Lactobacillus*. Inkubacija se odvija 48 h pri 37 °C u aerobnim uvjetima.

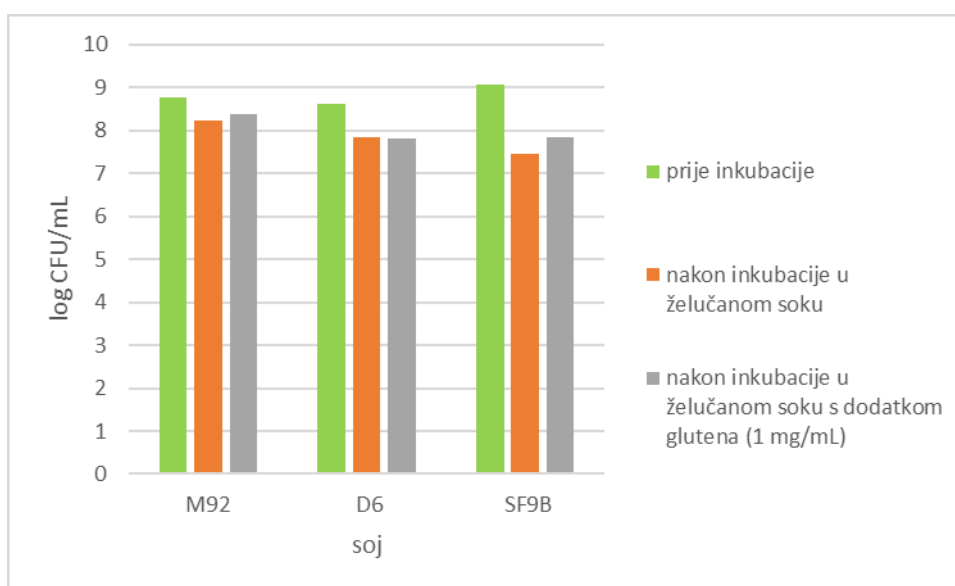


Slika 3. Prikaz testa koegzistencije

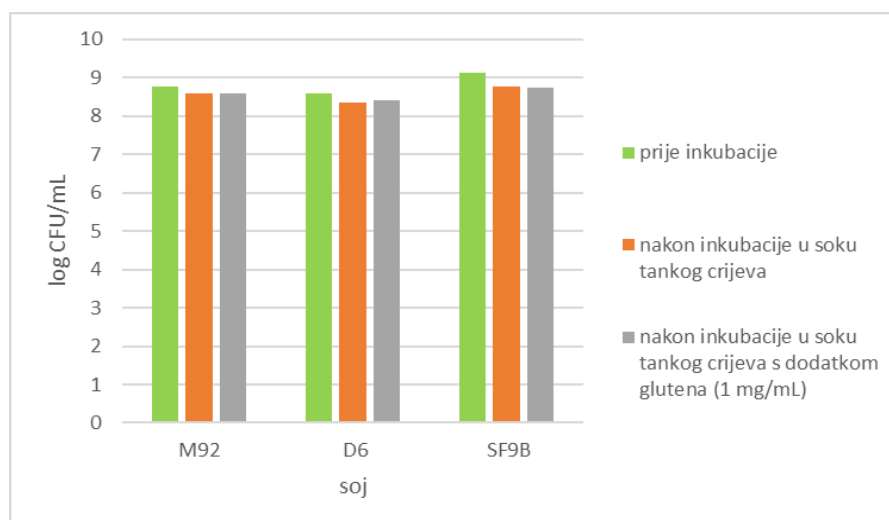
4. REZULTATI

4.1. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva u simuliranim uvjetima GIT-a uz dodatak glutena

Preživljavanje nepovoljnih uvjeta gastrointestinalnog sustava je jedan od ključnih kriterija pri odabiru probiotičkih sojeva jer je GIT ciljno mjesto njihovog djelovanja. Nepovoljni uvjeti u želucu podrazumijevaju prisutnost pepsina, pH vrijednost pH=2 i udio NaCl 0,5 % (w/v), dok sok tankog crijeva sadrži žučne soli i pankreatin te ima pH vrijednost pH=8. U ovom radu, ispitano je preživljavanje *Lactobacillus* sojeva u simuliranom soku želuca i tankog crijeva te istih sokova uz dodatak glutena (γ =1 mg/mL). Rezultati ispitivanja prikazani su na Slikama 4 i 5.



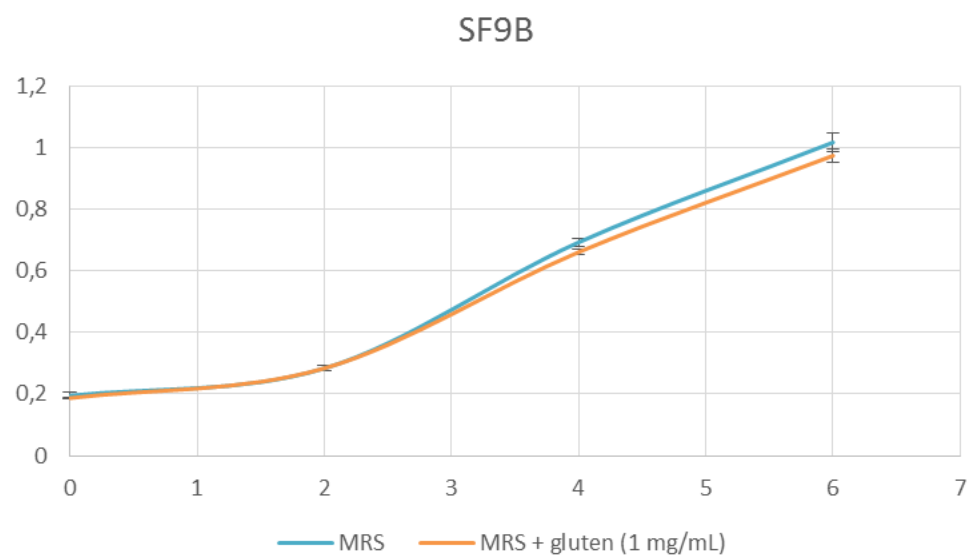
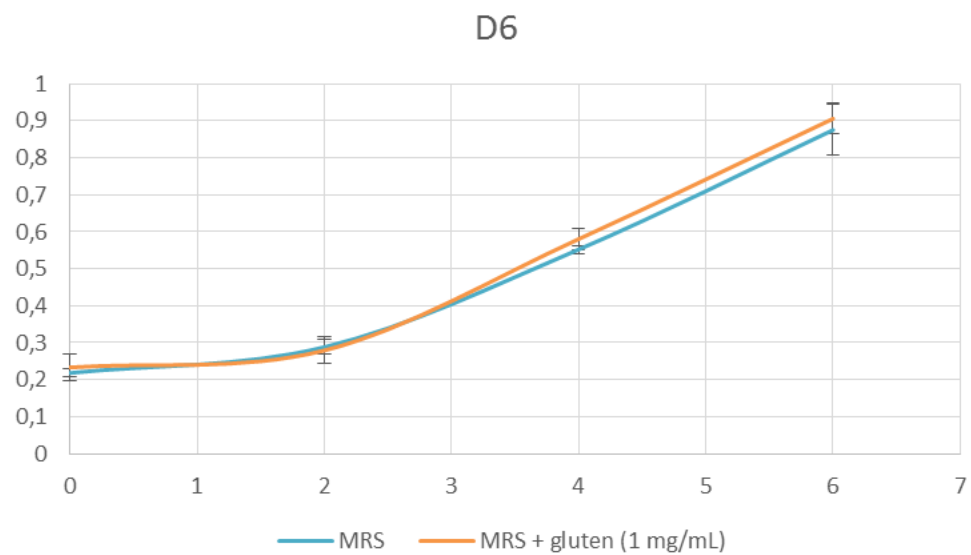
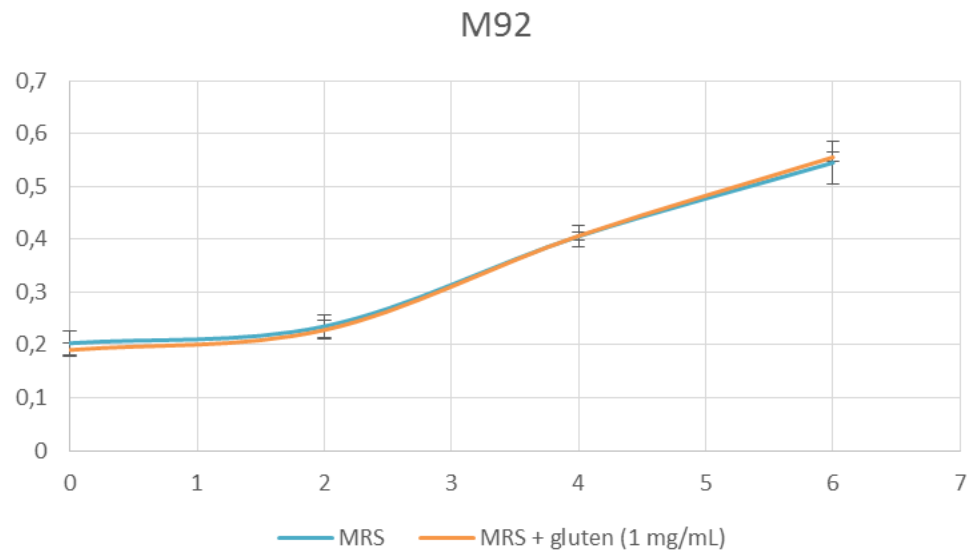
Slika 4. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva u simuliranom želučanom soku sa i bez dodatka glutena



Slika 5. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva u simuliranom soku tankog crijeva sa i bez dodatka glutena.

4.2. Utjecaj glutena na rast *Lactobacillus* sojeva

Provedeno je usporedno praćenje rasta *Lactobacillus* sojeva u MRS bujonu, koji je optimalna hranjiva podloga za uzgoj BMK te u MRS bujonu s dodatkom glutena ($\gamma=1$ mg/mL), kako bi se ispitalo utječe li prisutnost glutena na sposobnost rasta odabranih sojeva. Rezultati ispitivanja vidljivi su na Slici 6.



Slika 6. Rast *Lactobacillus* sojeva u MRS podlozi sa i bez dodatka glutena.

4.3. Test koegzistencije *Lactobacillus* sojeva

Kako bi se provjerila kompatibilnost probiotičkih sojeva *in vitro* proveden je test koegzistencije naciepljivanjem sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *L. brevis* D6, *L. paraplantarum* SF9B i *L. plantarum* D13 na istu MRS podlogu povlačenjem crta mikrobiološkom ušicom u obliku mrežice (Slika 7).



Slika 7. Test koegzistencije odabranih *Lactobacillus* sojeva.

5. RASPRAVA

Složena mikrobiota prisutna u GIT-u čovjeka, neophodna je za pravilno funkcioniranje organizma i ima niz korisnih učinaka na zdravlje domaćina. Najvažniji učinci bakterija mliječne kiseline, koje čine važan dio autohtone mikrobiote čovjeka, su modulacija imunosnog sustava, sinteza vitamina B, bakteriocina i proteolitičkih enzima, poticanje resorpcije željeza, kalcija i magnezija te antimikrobno djelovanje protiv patogenih bakterija poput vrsta iz rodova *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Shigella* itd. Uslijed različitih bolesti, stresnih uvjeta iz okoliša, loše prehrane ili terapije antibioticima, može doći do narušavanja ravnoteže crijevne mikrobiote, što može dovesti do brojnih problema. Kako bi se ponovno uspostavila stabilna crijevna mikrobiota, ljudi često posežu za probiotičkim sojevima prisutnim u funkcionalnoj hrani ili komercijalnim pripravcima. Svaki komercijalno dostupan soj mora proći niz strogih zahtjeva koji su dio složene strategije za izbor probiotičkih sojeva.

Bakterije mliječne kiseline se već dugo vremena koriste u proizvodnji hrane kao starter kulture, biotehnološkoj proizvodnji specifičnih metabolita i funkcionalnih dodataka prehrani, a u novije vrijeme se istražuje i njihova uloga bioterapeutika zbog brojnih korisnih učinaka koje imaju na zdravlje. Nakon ulaska u gastrointestinalni trakt domaćina, probiotičke bakterije su izložene raznim nepovoljnim uvjetima pa se razvijaju različite strategije koje će omogućiti njihovu povećanu otpornost u stresnim uvjetima. Sekvenciranjem genoma bakterija te raznim post-genomičkim pristupima, omogućena je identifikacija gena i proteina koji sudjeluju u prilagodbi bakterijskih stanica na nepovoljne uvjete. Među proteinima bitnim za preživljavanje nepovoljnih uvjeta GIT-a, najviše se ističu S-proteini koji čine 10% ukupnih proteina stanice u eksponencijalnoj fazi rasta. Sloj S-proteina je makromolekularni sloj proteina ili glikoproteina prisutan na površini Gram-pozitivnih i Gram-negativnih eubakterija te arheobakterija. Kod Gram-pozitivnih bakterija, vezan je na peptidoglikanski sloj stanične stijenke i djeluje kao zaštitni omotač, molekularno sito, faktor virulencije u patogenih vrsta i kao hvatač molekula i iona. Sloj S-proteina stanici pruža veću otpornost pri preživljavanju niskog pH, naglih promjena temperature, žučnih soli i sokova gušterače, što je neophodan preduvjet za adheziju na crijevni epitel, antimikrobno djelovanje i stimulaciju imunološkog sustava. Svi sojevi korišteni u ovom završnom radu posjeduju sloj S-proteina.

Budući da je preživljavanje nepovoljnih uvjeta GIT-a prvi neophodan uvjet za kolonizaciju alohtonih bakterija, u ovom radu je ispitano preživljavanje sojeva u simuliranom soku želuca i tankog crijeva te istih sokova uz dodatak glutena ($\gamma=1$ mg/mL). Gluten je ljepljiva bjelanjčevinasta tvar koja se nalazi u pšenici, raži, ječmu i piru, a sastoji se od dvije

frakcije; glutenina i glijadina. Gluten je važna komponenta žitarica pri proizvodnji pekarskih proizvoda jer daje tijestu elastičnost i viskozitet, pojačava kapacitet apsorpcije vode i utječe na organoleptička svojstva. U posljednje vrijeme se našao pod udarom brojnih kritičara koji smatraju da gluten uzrokuje oštećenja probavnog trakta i kod osoba koje ne boluju od celijakije te da uslijed tih oštećenja dolazi do poremećaja u radu štitnjače i pojave različitih autoimunih bolesti poput lupusa i dijabetesa tipa 1. Celijakija je imunološki posredovana glutenska enteropatija kod genetski predisponiranih osoba. Budući da svakodnevnom prehranom unosimo velike količine glutena u naš probavni sustav, ispitali smo utječe li gluten na preživljavanje probiotičkih sojeva prisutnih u GIT-u. Rezultati ispitivanja preživljavanja *Lactobacillus* sojeva u simuliranim sokovima GIT-a vidljivi su na Slikama 4 i 5 i pokazuju da dodatak glutena u koncentraciji $\gamma=1$ mg/mL nema statistički značajan učinak na preživljavanje BMK. Budući da ispitani bakterijski sojevi bolje preživljavaju inkubaciju u simuliranom soku tankog crijeva nego u simuliranom soku želuca, otpornost sojeva na nepovoljne uvjete u želucu može smatrati glavnim selektivnim izbornim kriterijem pri odabiru probiotičkih sojeva.

Također je ispitan utjecaj dodatka glutena u podlogu za rast odabranih *Lactobacillus* sojeva. Dobiveni rezultati (Slika 6) pokazuju da dodatak glutena u koncentraciji $\gamma=1$ mg/mL nema nikakvog utjecaja na rast BMK u optimalnoj MRS podlozi. Ne može se sa sigurnošću reći da gluten nema nikakav utjecaj na probiotičke sojeve u GIT-u jer je moguće da bi rezultati bili drugačiji da je upotrijebljena viša koncentracija glutena.

Test koegzistencije služi za provjeru kompatibilnosti probiotičkih sojeva *in vitro* što je nužno kako bi se ispitalo mogu li se odabrani sojevi koristiti kao združene probiotičke kulture. Naime, bakterije mogu antagonistički djelovati prema drugim bakterijskim sojevima čime snižavaju njihovu sposobnost preživljavanja što posljedično dovodi do smanjenja učinkovitosti primijenjenog probiotika. Iz testa koegzistencije (Slika 7) se može zaključiti da ispitani sojevi ne pokazuju antagonizam i da mogu rasti kao združena kultura u istoj hranjivoj podlozi.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Dodatak glutena u koncentraciji $\gamma=1$ mg/mL nema utjecaja na preživljavanje *Lactobacillus* sojeva u nepovoljnim uvjetima GIT-a. Svi ispitani sojevi (*L. helveticus* M92, *L. brevis* D6 i *L. paraplantarum* SF9B) su preživjeli inkubaciju u želučanom soku i soku tankog crijeva, bez obzira na dodatak glutena.
- 2) Turbidimetrijsko praćenje rasta ispitanih sojeva u optimalnoj MRS podlozi sa i bez glutena ($\gamma=1$ mg/mL), pokazalo je da gluten ne utječe na rast *Lactobacillus* sojeva.
- 3) Iz testa koegzistencije se može zaključiti da ispitani sojevi ne pokazuju antagonizam jedni prema drugima i da mogu rasti kao združena kultura u istoj hranjivoj podlozi.

7. LITERATURA

- Ahmed (2003) Genetically Modified Probiotics In Foods. *Trends Biotechnol.* **21**, 491-497.
- Althani, A. A., Marei, H. E., Hamdi, W. S., Nasrallah, G. K., El Zowalaty, M. E., Al Khodor, S., Al-Asmakh, M., Abdel-Aziz, H. and Cenciarelli, C. (2016) Human Microbiome and its Association With Health and Diseases. *J. Cell. Physiol.*, **231**, 1688–1694.
- Ammor, M.S., Mayo (2007) Selection Criteria For Lactic Acid Bacteria To Be Used As Functional Starter Cultures in Dry Sausage Production: An Update. *Meat Sci.* **76**, 138-46.
- Aragon-Alegro, L.C., Alarcon-Alegro, J.H., Cardarelli, H.R., Chiu, M.C., Sadd, S.M.I. (2007) Potentially Probiotic And Symbiotic Chocolate Mousse. *LWT-Food Sci. Technol.* **40**, 669-675.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti (2011) Probiotics And Health: An Evidence-based Review. *Pharmacol. Res.* **63**, 366-376.
- Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco (2003) The Intestine And Its Microflora Are Partners For The Protection Of The Host: Report In Danone Symposium The Intelligent Intestine. *Am J. Clin. Nutr.* **78**, 675-683.
- Cenit, M., Matzaraki, V., Tigchelaar, E., Zhernakova, A., (2014) Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 1981–1992.
- Cho, I., Blaser, M.J. (2012) The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 260–270.
- Conlin, P.R., Chow, D., Miller, E.R., Svetkey, L.P., Lin, P.H., Harsha, D.W., Moore, T.J., Sacks, F.M., Appel, L.J. (2000) The Effect Of Dietary Patterns On Blood Pressure Control In Hypertensive Patients: Results From The Dietary Approaches To Stop Hypertension (DASH) Trial. *Am. J. Hypertension* **13**, 949-955.
- De Vuyst, L., Leroy (2007) Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, And Food Applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 194-199.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635–1638.

Erkkila (2001) Bioprotective And Probiotic Meat Starter Cultures For The Fermentation Of Dry Sausages. Academic Dissertation, Department of Food Technology, University of Helsinki, Finland.

Fleming, H.P. (1984) Development In Cucumber Fermentation. Solid State Fermentation Symposium, London, UK.

Florou-Paneri, P., Christaki, E., Bonos, E. (2013) Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. U: Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes, (Marcelino Kongo, J., ured.), *J. InTech*. **10**, 589-604.

Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G.,Swings (2003) Molecular Characterization Of Tet(M) Genes In Lactobacillus Isolates From Different Types Of Fermented Dry Sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1270-1275.

Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H.J. (1992) Probiotics; A General View U: “The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease”, vol. 1. (Wood, B.J.W., ed.) Elsevier Applied Science, London, 151-170.

Hutkins, R.W. (2006) Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Publishing, Iowa, USA. 24

Johnson-Green (2002) Introduction To Food Biotechnology. CRC Press, Boca Raton.

Karma, B.K.L., Emata, O.C., Barraquio, V.L. (2007) Lactic Acid And Probiotic Bacteria From Fermented And Probiotic Dairy Products. *Sci. Diliman*. **19**, 23-34.

Korhonen (2010) Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. Dissertations in Forestry and Natural Sciences, University of Eastern Finland.

Laparra, J.M., Sanz, Y. (2010) Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol. Res.* **61**, 219–225.

Ley, R.E., Peterson, D.A., Gordon, J.I. (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* **124**, 837–848.

Mc Donald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. (1991) The Biochemistry Of Silage, 2nd ed. Chalcombe Publications, Aberystwyth, UK.

Metchnikoff II, Chalmer Mitchell (1910) *Nature Of Man Or Studies In Optimistic Philosophy*. Kessinger Publishing, Whitefish, MT, USA.

O'Hara, A.M., Shanahan, F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **7**, 688–693.

O'Shea, E.F., Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P., Hill (2012) Production Of Bioactive Substances By Intestinal Bacteria As A Basis For Explaining Probiotic Mechanisms: Bacteriocins And Conjugated Linoleic Acid. *Int. J. Food Microbiol.* **152**, 189-205.

Parker, R.B. (1974) Probiotics, The Other Half Of The Antibiotic Story. *Animal nutr. health*.

Paulino, L.C., Tseng, C-H, Strober, B.E., Blaser, M.J. (2006) Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2933–2941.

Ray (1992) The Need For Food Biopreservation. In: Ray B, Daeschel M, editors. Food biopreservatives of microbial origin Boca Raton, Florida: *CRC Press*, str. 123.

Sandine, W.E. (1996) Commercial Production Of Dairy Starter Cultures. In: Cogan TM, Accolas JP, editors. Dairy Starter Cultures. Wiley-VCH. New York, USA.

Shah, N.P. (2007) Functional Cultures And Health Benefits. *Int. Dairy J.* **17**, 1262-1277.

Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S.C., Goulet, J., Tompkins, T.A. (2005) Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- And Enteropathogenic E. Coli O127:H6-Induced Changes In Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers By Reducing Bacterial Adhesion And Cytoskeletal Rearrangements. *Infect. Immun.* **73**, 5183-5188.

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B., Ross, R.P. (2001) Market Potentials For Probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 476-483.

Suzzi, G., Gardini (2003) Biogenic Amines In Dry Fermented Sausages: A Review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 41-54.

Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Šušković, J., „Fermentacija kiselog kupusa“, Predavanja iz kolegija „Probiotici i starter kulture“, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilište u Zagrebu, 2014.

Tamine, A.Y., Saarela, M., Korslund, S.A., Mistry, V.V, Shah, N.P. (2005) Production And Maintenance Of Viability Of Probiotic Micro-organisms In Dairy Products. In: Tamine AY, editor. Probiotic Dairy Products. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, str.3972.

Upadrasta, A., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G., and Ross, R. P. (2011). Improving the Stress Tolerance of Probiotic Cultures: Recent Trends and Future Directions in Stress Response of Lactic Acid Bacteria, (Tsakalidou, E. i Papadimitriou, K., ured.). Springer, New York. str. 395-438.

Walker, W.A. (2008) Mechanisms Of Action Of Probiotics. *Clinic. Inf. Dis.* **46**, 2-87.